

原 著

マウス腹腔マクロファージの *Mycobacterium avium* complex に対する *in vitro* 抗菌活性に及ぼす麻黄附子細辛湯, ヨクイニンの影響

清水 利朗 佐野 千晶 赤木 竜也 小笠原圭子
佐藤 勝昌 富岡 治明

島根医科大学微生物・免疫学

EFFECTS OF THE CHINESE TRADITIONAL MEDICINES "MAO-BUSHI-SAISHIN-TO" AND "YOKUININ" ON THE ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY OF MURINE MACROPHAGES AGAINST *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX INFECTION

Toshiaki SHIMIZU, Chiaki SANO, Tatsuya AKAKI, Keiko OGASAWARA, Katsumasa SATO, and *Haruaki TOMIOKA

*Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University

We previously examined the effects of two Chinese traditional medicines "Mao-Bushi-Saishin-To" (MBST) and "Yokuinin", on the therapeutic efficacies of a benzoxazinorifamycin, KRM-1648, against *Mycobacterium avium* complex (MAC) infection induced in mice. MBST but not Yokuinin potentiated the therapeutic activity of KRM-1648 against MAC infection. In the present study, we examined the effects of these traditional medicines on some M ϕ cell functions. First, MBST significantly potentiated M ϕ anti-MAC antimicrobial activity, while Yokuinin did so to a much lesser extent. Secondly, MBST and Yokuinin each strongly inhibited production of nitric oxide (NO) in MAC-infected M ϕ s. Thirdly, treatment of M ϕ s with MBST or Yokuinin caused reductions in the accumulation of IL-10 in culture fluids by MAC-infected M ϕ s during the first 2-days cultivation. On the other hand, in the separate experiment, treatment of M ϕ s with these drugs caused no significant change in the accumulation of TGF- β by MAC-infected M ϕ s at day 7. These findings suggest that these Chinese traditional medicines, particularly MBST, potentiate M ϕ anti-MAC antimicrobial activity, however, NO do not appear to be crucial effectors in the anti-MAC activity of MBST- or Yokuinin-treated M ϕ s. Moreover, MBST- and Yokuinin-mediated down-regulation of the production of IL-10 in MAC-infected M ϕ s may be related to their potentiating effects on M ϕ anti-MAC activity.

Key words : *Mycobacterium avium*, Mao-Bushi-Saishin-To, Yokuinin, Nitric oxide, IL-10, TGF- β

キーワード : *Mycobacterium avium*, 麻黄附子細辛湯, ヨクイニン, Nitric oxide, IL-10, TGF- β

*〒693-8501 島根県出雲市塩冶町89-1

* 89-1 Enya-cho, Izumo-shi, Shimane 693-8501 Japan.
(Received 26 Feb. 1999 / Accepted 9 Jun. 1999)

はじめに

Mycobacterium avium complex (MAC) 感染症の難治性には、本菌の諸種抗菌剤に対する耐性や宿主マクロファージ (Mφ) 内での強い生存力などの諸要因に加えて、感染宿主に誘導される免疫抑制性サイトカインカスケードの活性化も一つの要因として関わっている可能性が考えられている^{1)~3)}。なかでも IL-10 や transforming growth factor- β (TGF- β) は Mφ の過度な活性化に伴い、免疫抑制性サイトカインとして産生される傾向が強く^{4)~6)}、感染部位における炎症反応、特に過度な遅延型過敏症反応を抑えることができればこのような Th 2 タイプのサイトカインや Mφ 不活化サイトカインを中心とする抑制性サイトカインカスケードの活性化への流れを回避することが、ある程度可能になるものと考えられる。このような観点から、先に、著者らは実験的マウス MAC 感染症モデルを用いた実験系でベンゾキサジノリファマイシン KRM-1648 (KRM) と漢方薬である麻黄附子細辛湯 (MBST) との併用投与により KRM の治療効果を有意に増強することができることを報告している⁷⁾。

ところで麻黄附子細辛湯は抗アレルギー作用または抗炎症作用などを有する麻黄、附子、細辛から成る漢方薬であり^{8)~10)}、その薬効成分としてはエフェドリン (麻黄) などが知られているが、薬理作用についてはなお不明な点もある。他方、ヨクイニンは主にハトムギ抽出成分から成り、抗ウイルス作用のほかに抗炎症作用、抗腫瘍活性なども認められている^{11)~13)}。したがって、これらの漢方薬はいずれも MAC 感染宿主の免疫応答、特に宿主 Mφ 諸機能に対して何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。

そこで今回は、MBST とヨクイニンの MAC 感染宿主 Mφ 内の MAC 菌の増殖に及ぼす影響について検討するとともに、宿主 Mφ の殺菌エフェクター nitric oxide (NO) の産生能、あるいは IL-10 や TGF- β などの免疫抑制性サイトカインの産生能に及ぼす影響についても、若干の検討を行った。

材料と方法

1) 供試菌

MAC 症の患者より分離された *M. avium* N-444 株 (血清型 8) を 7H9 培地で培養後、遠心洗浄し 0.1% 牛血清アルブミン加磷酸緩衝生理食塩水に浮遊させたものを -80℃ に保存し、用時溶解して実験に供した。

2) 供試薬剤

MBST (小太郎漢方製薬)、ヨクイニン (同) を供試した。なおこれらの薬剤は用時生理食塩水に溶解させた

ものを用いた。

3) マウス腹腔 Mφ 内局在 MAC 菌に対する抗菌作用

ザイモザン A (1mg) を BALB/c 系雌マウス (10~12 週齢) の腹腔内へ投与し、4 日後に 2% 牛胎児血清を加えた Hanks 氏液で腹腔浸出細胞を採取した。同緩衝液で遠心洗浄後得られた細胞を 5% 牛胎児血清 (FBS) 加 RPMI 1640 培地に浮遊させ、 3×10^5 細胞/well になるように 6 mm 径の培養ウェル (96-Well: Becton Dickinson) にまき、5% CO₂ 下、37℃ で 2 時間培養した。次いで 2% FBS 加 HBSS で非付着細胞を洗浄除去し、得られた付着細胞を腹腔 Mφ として用いた。この Mφ 単層培養に 10 μ g/ml あるいは 100 μ g/ml の MBST またはヨクイニンを含有する 5% FBS 加 RPMI 培地の 0.2ml を加え、2 日間の培養を行った後、培地を除去して 2% FBS 加 HBSS でウェルを洗浄した。これに 5% FBS 加 RPMI 培地に浮遊させた MAC 菌液 (1.5×10^6 CFU/ml) の 0.1ml を加えてさらに 2 時間培養し、非貪食菌を 2% FBS 加 HBSS で洗浄除去した後、再び上述の薬剤を含有する培地を加え、さらに 7 日間にわたって培養した。所定の時間にウェルに 0.23% ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 80 μ l を加えて細胞を溶解させた後、次いで 120 μ l の 20% BSA 加 PBS を加えて SDS を中和した後、得られた細胞溶解液中の CFU を 7H11 寒天培地上で計測した。

4) Mφ のサイトカイン産生能の測定

上述の実験での MAC 感染あるいは非感染 Mφ の培養上清中の IL-10 および TGF- β の濃度を、捕捉抗体として抗 IL-10 およびマウス抗 TGF- β 抗体、次いでキャッピング抗体としてビオチン標識させた抗 IL-10 抗体またはトリ抗 TGF- β 抗体を用いて反応させた後、IL-10 の場合はさらにアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンを、他方、TGF- β の場合にはアルカリフォスファターゼ標識抗トリ IgG 抗体を各々反応させた。次いで p-ニトロフェニルリン酸 (Sigma) を基質としての呈色反応を行い、各々のサイトカイン濃度を測定した。

5) Mφ の NO 産生能

上述と同様な方法で 16mm 径の培養ウェル上に調製した腹腔 Mφ の単層培養を MBST あるいはヨクイニン処理した後、これに MAC 菌 (2.5×10^7 CFU/well) を感染させ、次いで 37℃ で 2 日間培養し、その培養上清中の NO₂⁻ 濃度を Griess 法¹⁴⁾ により測定した。

結 果

1) MBST、ヨクイニン処理腹腔 Mφ 内での MAC 菌の増殖動態

Fig. 1 には、MBST およびヨクイニンの Mφ 抗菌活

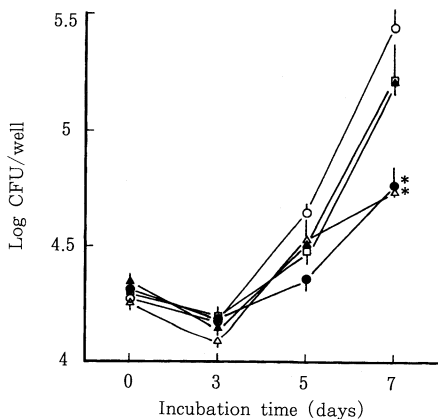


Fig. 1 Effects of MBST and Yokuinin on Mφ antimicrobial activity against MAC. Mφ monolayer culture on a 6.0-mm well was pretreated in 5% FBS-RPMI 1640 medium in the absence (○) or presence of 10 or 100 μg/ml each of MBST (●, ▲) or Yokuinin (◻, ◼) for 2 days, thereafter infected with MAC organisms (1.5×10⁶ CFU/ml) for 2 hr, and cultivated in the presence or absence of corresponding test drugs for up to 7 days to monitor intracellular growth of MAC organisms. Each symbol indicates the mean ± S.E.M. (n=3). *: Significantly smaller than the value of untreated control Mφs (p<0.05; Student's t-test).

性に及ぼす影響についての成績を示した。まず 96 ウェルプレートに調製した Mφ 単層培養を MBST あるいはヨクイニンで 2 日間処理後、付着細胞をニグロシン染色し、鏡検法で生細胞数をカウントしたところ、薬剤非添加の系での付着生細胞数を 100% とした場合の生細胞数は 1 μg/ml MBST ; 96%, 10 μg/ml MBST ; 124%, 100 μg/ml MBST ; 135%, 一方、1 μg/ml ヨクイニン ; 95%, 10 μg/ml ヨクイニン ; 99%, 100 μg/ml ヨクイニン ; 131% であり供試薬剤の生存数に及ぼす影響は特に認められなかった。次に MAC 菌液を加えて 2 時間後の CFU (log CFU/well) は薬剤非添加 ; 4.28 ± 0.01, 10 μg/ml MBST ; 4.31 ± 0.01, 100 μg/ml MBST ; 4.27 ± 0.03, 10 μg/ml ヨクイニン ; 4.35 ± 0.01, 100 μg/ml ヨクイニン ; 4.31 ± 0.01 であり MBST あるいはヨクイニン処理の Mφ 食菌能に及ぼす影響は特に認められなかった。他方、Fig. 1 に示すように、感染後 7 日では MBST (10 μg/ml, 100 μg/ml) 処理 Mφ では、対照 Mφ の場合に比べて、細胞内局在 MAC 菌の増殖

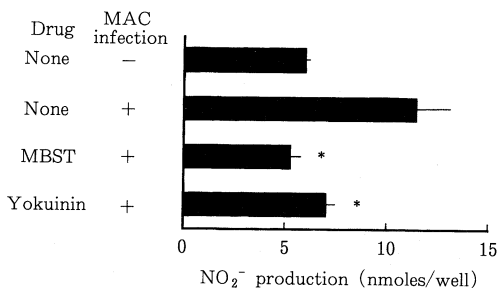


Fig. 2 Effects of MBST and Yokuinin on NO production by MAC-infected Mφs. Mφ monolayer culture on a 16-mm well was pretreated with 30 μg/ml each of MBST or Yokuinin for 2 days, thereafter infected with MAC organisms (2.5×10⁷ CFU/ml) for 2 hr, and cultivated in fresh medium for 24 hr to measure the NO production. Each bar indicates the mean ± S.E.M. (n=3). *: Significantly smaller than the value of untreated control Mφs (p<0.01; Student's t-test).

が有意に抑制された (p<0.05)。同様にヨクイニン (10 μg/ml, 100 μg/ml) 処理 Mφ についても細胞内局在 MAC 菌の若干程度の増殖抑制が認められた。したがって MBST やヨクイニンは、弱いながら Mφ の抗 MAC 抗菌力に対する増強作用を有するものと考えられる。

2) MAC 感染 Mφ の NO 産生能に及ぼす MBST, ヨクイニンの影響

Fig. 2 は MAC 感染 Mφ の NO 産生能に及ぼす MBST, ヨクイニンの影響をみたものであるが, MBST, ヨクイニン処理によりいずれの場合も Mφ の NO 産生能が低下した。なお, この傾向は MBST 処理 Mφ でやや強かった。

3) MAC 感染 Mφ の IL-10, TGF-β の産生能に及ぼす MBST, ヨクイニンの影響

Fig. 3 は MAC 感染 Mφ の IL-10, TGF-β 産生に及ぼす MBST, ヨクイニンの影響をみたものであるが, MAC 感染 Mφ の培養早期に産生のみられる IL-10 については MBST, ヨクイニン処理のいずれの場合も MAC 感染 Mφ からの産生を抑制する傾向が認められた。またその効果はヨクイニンの方が MBST よりも顕著であった。一方, 培養 7 日目以降に産生のみられる TGF-β に関しては MBST 処理によつては Mφ の TGF-β の産生にはほとんど影響はみられなかった。他方, ヨクイニン処理では MAC 感染 Mφ の TGF-β 産生能が若干亢進する傾向が認められた。

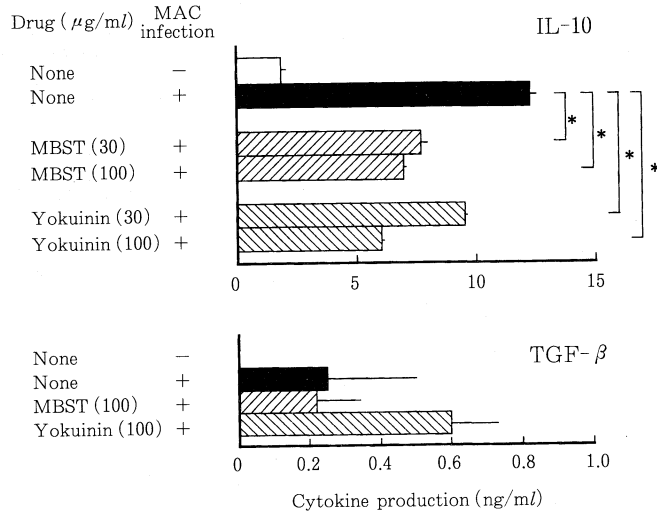


Fig. 3 Effects of MBST and Yokuinin on IL-10 and TGF- β production by MAC-infected M ϕ s. M ϕ monolayer cultures in 6.0-mm culture wells were pretreated with the indicated concentrations of MBST or Yokuinin for 2 days, thereafter infected with MAC organisms (1.5×10^6 CFU/ml) for 2 hr, and cultivated in the presence or absence of corresponding test drugs for up to 2 and 7 days to measure subsequent production of IL-10 and TGF- β , respectively. Each bar indicates the mean \pm S.E.M. ($n=4$). *: Significantly smaller than the value of untreated control M ϕ s ($p < 0.01$; Student's t -test).

考 察

今回、抗炎症活性を有することの知られる漢方薬である MBST およびヨクイニンの、マウス腹腔 M ϕ 機能に及ぼす作用について、特に MAC 殺菌能に関わる M ϕ 機能に注目して検討を行った訳であるが、M ϕ をこれらの薬剤で処理した場合、M ϕ 内での MAC 菌の増殖動態に若干の抑制傾向が認められた。ところが、MAC 感染 M ϕ の NO 産生能は、これらの薬剤処理によって逆に弱いながら抑制を受けることが分かった。また別の実験で、MAC 感染 M ϕ の活性酸素産生能が MBST 処理によって抑制されるといった成績も得られている(成績省略)。

先にわれわれは^{15)~17)}、MAC 菌体刺激 M ϕ における抗 MAC 殺菌エフェクター産生の経時的变化についての検討を行い、M ϕ の MAC 菌体での刺激後、速やかな活性酸素の産生が一過性(0~2 時間)にみられた後、これよりやや遅れて遊離脂肪酸の遊離が始まり、48 時間まで持続するが、NO の産生は活性酸素の産生が終息した phase 以降に始まり、その後 72 時間以上にわたり徐々に亢進していくことを見だしている。さらに、これら

の殺菌エフェクターのうち特に NO と遊離脂肪酸との間には協同作用が認められることから、M ϕ 殺菌エフェクターとして MAC 殺菌活性に最も効果的な組合せは NO+遊離脂肪酸であることが明らかになっている。

今回の成績を勘案するに、MBST やヨクイニン処理 M ϕ にみられる抗 MAC 殺菌活性の増強現象においては、NO 以外の他の M ϕ 内殺菌エフェクターの作用あるいはそれらと NO との協同作用が、M ϕ の抗 MAC 活性の発現に重要であることを示唆しているもののように思われる。

ところで、今回の MAC 感染 M ϕ よりのサイトカイン産生能に及ぼす MBST、ヨクイニン処理の影響についての検討では、IL-10 産生に対してはこれら漢方薬による有意な抑制作用が認められたが、TGF- β の産生には特に有意な影響はみられなかった。なお、最近われわれの行った検討では、M ϕ から産生される endogenous な IL-10 や TGF- β は M ϕ の MAC 殺菌能に対して有意な down-regulation 作用を示しえないといった成績が得られており^{18) 19)}、Bermudez^{20) 21)} らの提唱するような M ϕ の MAC 殺菌能の endogenous な IL-

10や TGF- β による抑制という考え方には再考の余地があるのかもしれない。この点については、今後さらに詳しい検討を進める必要があるものと考えられる。

謝 辞

麻黄附子細辛湯，ヨクイニンを分与頂いた小太郎漢方製薬株式会社に深謝します。

文 献

- 1) 富岡治明：抗酸菌感染症が難治性である理由を探る。日本細菌学雑誌。1995；50：687-701.
- 2) 富岡治明：抗酸菌症と免疫。臨床と微生物。1997；24：45-52.
- 3) 赤木竜也，佐藤勝昌，富岡治明，他：マウス実験的 *Mycobacterium avium* 感染症に対するペンゾキサジノリファマイシン KRM-1648，クラリスロマイシンおよびレボフロキサシンの *in vivo* 治療効果：非ステロイド抗炎症剤ジクロフェナク Na 投与の影響。結核。1997；72：491-497.
- 4) Sieling PA, Abrams JS, Yamamura M, et al.: Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. *In vitro* modulation of T cell responses in leprosy. *J Immunol*. 1993；150：5501-5510.
- 5) Tossi Z, Young T-G, Averill LE, et al.: Induction of transforming growth factor β -1 by purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1995；63：224-228.
- 6) Dahl K, Shiratsuchi H, Hamilton BD, et al.: Selective induction of transforming growth factor β in human monocytes by lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1996；64：399-405.
- 7) 佐藤勝昌，清水利朗，富岡治明，他：マウス実験的 *Mycobacterium avium* complex 感染に対する KRM-1648 の治療効果に及ぼす half-sized secretory leukocyte protease inhibitor，ヨクイニンおよび麻黄附子細辛湯の影響。結核。1998；73：501-506.
- 8) 加地正郎，柏木征三郎，林田和夫，他：高齢者の感冒および気管支炎に対する麻黄附子細辛湯エキスカプセルの効果。臨床と研究。1992；69：3278-3284.
- 9) 柴田浩樹，河野茂勝，大幡勝也：実験的アレルギーに及ぼす麻黄附子細辛湯の影響。アレルギー。1995；44：1234-1240.
- 10) 加地正郎，加地正英，柏木征三郎，他：麻黄附子細辛湯エキスカプセルのかぜ症候群に対する効果。臨床と研究。1995；72：2855-2859.
- 11) 八木 晟：ハトムギ（薏苡仁）の抗炎症・抗腫瘍活性。医薬ジャーナル。1989；25：545-548.
- 12) 山田義貴，出来尾哲，地土井襄璽：ヨクイニン内服が著効を呈した幼児の尖圭コンジロームの一例。皮膚科の臨床。1993；35：1020-1021.
- 13) 中川浩一：ヨクイニン内服が著効を示した尋常性疣贅の一例。新薬と臨床。1995；44：2067-2071.
- 14) Sato K, Akaki T, Tomioka H: Differential potentiation of anti-mycobacterial activity and reactive nitrogen intermediate-producing ability of murine peritoneal macrophages activated by interferon-gamma (IFN- γ) and tumour necrosis factor-alpha (TNF- α). *Clin Exp Immunol*. 1998；112：63-68.
- 15) Tomioka H, Sato K, Sano C, et al.: Effector molecules of the host defence mechanism against *Mycobacterium avium* complex: the evidence showing that reactive oxygen intermediates, reactive nitrogen intermediates, and free fatty acids each alone are not decisive in expression of macrophage antimicrobial activity against the parasites. *Clin Exp Immunol*. 1997；109：248-254.
- 16) Akaki T, Sato K, Tomioka H, et al.: Effector molecules in expression of the antimicrobial activity of macrophages against *Mycobacterium avium* complex: roles of reactive nitrogen intermediates, reactive oxygen intermediates, and free fatty acids. *J Leukoc Biol*. 1997；62：795-804.
- 17) 富岡治明，佐藤勝昌，清水利朗，他：感染における生体防御機構。結核。1998；73：71-76.
- 18) Sano C, Sato K, Tomioka H, et al.: The modulating effects of proinflammatory cytokines interferon-gamma (IFN- γ) and tumour necrosis factor-alpha (TNF- α), and immunoregulating cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta (TGF- β), on anti-microbial activity of murine peritoneal macrophages against *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. *Clin Exp Immunol*. 1999；115：435-442.
- 19) Shiratsuchi H, Hamilton B, Tossi Z, et al.: Evidence against a role for interleukin-10 in the regulation of growth of *Mycobacterium*

- avium* in human monocytes. J Infect Dis. 1996; 173: 410-417.
- 20) Bermudez LE, Champsi J: Infection with *Mycobacterium avium* induces production of interleukin-10 (IL-10), and administration of anti-IL-10 antibody is associated with enhanced resistance to infection in mice. Infect Immun. 1993; 61: 3093-7.
- 21) Bermudez LE: Production of transforming growth factor- β by *Mycobacterium avium*-infected human macrophages is associated with unresponsiveness to IFN- γ . J Immunol. 1993; 150: 1838-45.